

CONFIRM™ anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Katalogové číslo 790-4286

INDIKACE A POUŽITÍ

Použití

Tato protilátka je určena k diagnostice *in vitro* (IVD).

Ventana Medical Systems' (Ventana) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Primary Antibody je králičí monoklonální protilátka (IgG) nasměrovaná proti C-koncové části antigenu Ki-67. Barvení na Ki-67 lze použít jako pomůcku při posuzování proliferativní aktivity normálních a neoplastických tkáních.^{1,2,3} Protilátka je určena k identifikaci zabarvených proliferativních buněk pomocí světelné mikroskopie v tkáňových řezech fixovaných ve formalinu, zalitých v parafínu na barvicích automatech Ventana.

Klinická interpretace jakéhokoli zabarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studii a hodnocením řádných kontrol. Hodnocení musí v kontextu klinické anamnézy pacienta a jiných diagnostických testů provádět kvalifikovaný patolog.

Souhrn a vysvětlení

Ki-67 je nukleární protein exprimující v proliferativních buňkách. Během buněčného cyklu se antigen Ki-67 vyskytuje ve fázích G1, S, G2 a M, ale není přítomen ve fázi G0 (klidová fáze).^{4,5}

Principy a postupy

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) lze použít jako primární protilátku pro imunohistochemické barvení parafinových tkáňových řezů. Obecně lze říci, že imunohistochemické barvení umožňuje vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifické protilátky (primární protilátky), která se váže na antigen, sekundární protilátky (vazebné protilátky), která se váže na primární protilátku, komplexu enzymů a chromogenního substrátu a je proložena promývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu způsobuje vznik viditelného produktu reakce v místě antigenu. Vzorek pak lze obarvit kontrastním barvivem a zakrýt krycím sklíčkem. Výsledky se interpretují pomocí světelného mikroskopu a pomáhají k usnadnění diferencní diagnózy patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí být spojeny s určitým antigenem.

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) je optimálně naředěna pro použití s detekční soupravou MIEW™ DAB, výrobce Ventana a barvicími automaty. CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) je kompatibilní s detekčními soupravami *ultraView™* Universal DAB, AEC a Enhanced Alkaline Phosphatase Red. Každý krok barvicího protokolu zahrnuje inkubaci se stanovením její přesné doby a specifické teploty. Na konci každého inkubačního kroku jsou řezy v barvicím automatu Ventana opláchnuty za účelem ukončení probíhající reakce a k odstranění nevazebného materiálu, který by mohl bránit požadované reakci v následujících krocích. Aby odpařování vodních reagentů ze vzorků na podložních sklech bylo co nejmenší, aplikuje barvicí automat na sklíčka krycí roztok. Barvení je ukončeno po inkubaci substrát-chromogenem a volitelně barvením kontrastním barvivem. Více informací o operacích přístroje naleznete v Návodu k obsluze k příslušnému barvicímu automatu Ventana.

MATERIÁLY A METODY

Dodávané reagentie

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) obsahuje dostatek reagentie pro 50 testů.

1 – 5 mL dávkovač CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) obsahuje přibližně 10 µg (2 µg/mL) králičí monoklonální protilátky nasměrované proti Ki-67 přítomnému ve tkáni. Protilátka je naředěna v pufru s obsahem proteinového nosiče a konzervační látky.

Rekonstituce, smísení, ředění, titrace

Protilátka je optimalizována pro použití v barvicím automatu Ventana ve spojení s detekční soupravou MIEW DAB. Není vyžadována rekonstituce, smísení, ředění nebo titrace.

Další ředění může způsobit ztrátu zabarvení antigenu. Uživatel musí případně změny ověřit. Rozdíly ve zpracování tkáně a technických postupech v laboratoři mohou způsobit výraznou variabilitu výsledků a vyžadují pravidelné provádění kontrol (viz část Postupy kontroly kvality).

Potřebné materiály a reagentie, které se nedodávají

Následující reagentie a materiály mohou být potřebné, ale nejsou součástí dodávky:

1. Ventana CONFIRM Negative Control Rabbit Ig
2. Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
3. Tkáňe pro pozitivní a negativní kontrolu
4. Sušička, schopná udržovat teplotu 70 °C ± 5 °C
5. Štítky s čárovým kódem (odpovídající testované negativní kontrole a primární protilátce)
6. 10 % neutrální pufovaný formalin
7. Nádoby nebo lázně na barvení
8. Stopky
9. Xylen
10. Etanol nebo reagenční alkohol
11. Deionizovaná nebo destilovaná voda
12. Dekloační komora Biocare Medical* (barvicí automaty iuz NexES® IHC)
13. Barvicí nádoby*
14. Barvicí automaty NexES IHC, BenchMark® Series
15. Detekční soupravy Ventana *ultraView™* Universal DAB, *iVIEW* DAB, AEC a Enhanced Alkaline Phosphatase Red*
16. Ventana Amplification Kit*
17. Ventana Endogenous Biotin Blocking Kit*
18. Ventana APK Wash* (10X) (barvicí automaty NexES IHC)
19. Ventana Liquid Coverslip™ (Low Temperature)* (barvicí automaty NexES IHC)
20. Ventana EZ Prep™ (10X)* (barvicí automaty BenchMark Series)
21. Ventana Reaction Buffer (10X)* (barvicí automaty BenchMark Series)
22. Ventana Liquid Coverslip (High Temperature)* (barvicí automaty BenchMark Series)
23. Ventana Cell Conditioning 1 (předem naředěné) (barvicí automaty BenchMark Series)
24. 1 mM pufr EDTA (pH 8,0)
25. Kontrastní barvivo Ventana Hematoxylin II
26. Ventana Bluing Reagent
27. Montovací médium
28. Krycí sklo
29. Světelný mikroskop (20 – 80x)

* Podle potřeby specifických aplikací

Skladování a manipulace

Skladovat při 2 – 8 °C. Nezmrazovat. Pokud se reagentie skladují za jakýchkoli jiných než v příbalovém letáku uvedených podmínek, musí je uživatel ověřit.

Aby byl zajištěn správný výkon a správná stabilita protilátky po každém cyklu, musí být dávkovač uzavřen víčkem a okamžitě umístěn ve vertikální poloze do lednice.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Je-li řádně skladováno, je reagens stabilní do data uvedeného na štítku. Nepoužívejte reagentie po skončení expirační doby pro předepsanou metodu skladování.

Tento produkt nejeví žádné zjevné známky nestability, a proto by se pozitivní a negativní kontroly měly provádět současně s neznámými vzorky. Kontaktujte místní zastoupení společnosti Ventana, objeví-li se příznaky nestability reagentie.

Sběr vzorků a příprava pro analýzu

Pro použití s primární protilátkou, která je použita s detekčními soupravami Ventana na barvicích automatech Ventana jsou vhodné tkáňe, zpracované běžným způsobem, fixované ve formalínu a zalité v parafínu (viz část Potřebné materiály a reagentie, které nejsou součástí dodávky). Doporučený fixační prostředek pro tkáňe je 10 % neutrální pufovaný formalin.⁶ Mohou se vyskytnout rozdílné výsledky jako důsledek prodloužené fixace nebo speciálních procesů, například odvápnování preparátů kostní dřevě.

Každý řez je třeba nařezat na správnou tloušťku a umístit na pozitivně nabitě podložní sklíčko. Sklíčka obsahující řezy tkání je třeba sušit v troubě po dobu nejméně 2 hodin (avšak ne déle než 24 hodin) při teplotě 70 °C ± 5 °C .

Postup ruční deparafinace

Je vyžadováno, pokud je použit barvicí automat NexES IHC nebo pokud není navolena funkce deparafinace na sériovém barvicím automatu BenchMark Series:

1. Podrobnější pokyny, kdy je potřeba opatřit sklíčka štítkem s čárovým kódem naleznete v části Návod k použití ke konkrétnímu barvicímu automatu.
2. Ponořit sklíčka postupně do 3 xylenových lázní vždy na 5 ± 1 minutu.
3. Přenést sklíčka do 100 % etanolu a ponořit je postupně do 2 lázní vždy na 3 ± 1 minutu.
4. Přenést sklíčka do 95 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minutu.
5. Přenést sklíčka do 80 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minutu.

- Přenést sklička do lázně s deionizovanou nebo destilovanou vodou a ponořit je minimálně 10krát.
- Přenést sklička podle postupu do roztoku APK Wash (1X) nebo do pufového roztoku. V případě použití roztoku APK Wash, musí sklička zůstat v roztoku až do provedení barvicího cyklu. V případě použití pufového roztoku, musí sklička zůstat v roztoku, až do doby provedení postupu odmaskování antigenu. Nenechat sklička vysušit.

Sklička barvená na sériových barvicích automatech BenchMark Series mohou být deparafinována v přístroji. Zvolíte-li tuto možnost, opatříte sklička čárovým kódem a umístíte je do přístroje. Jestliže tuto možnost nezvolíte, pokračujte podle Postupu ruční deparafinace výše.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

- Při manipulaci s reagensy dodržte příslušná bezpečnostní opatření. Používejte rukavice na jedno použití, manipulujete-li s nebezpečnými karcinogeny nebo toxickými materiály (jako je například: xylen nebo formaldehyd).
- Zabraňte kontaktu reagensů s očima a sliznicí. Jestliže se reagent dostane do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
- Vzorky pacientů a všechny materiály, které s nimi přijdou do kontaktu, musí být považovány za biologicky nebezpečné látky a jejich likvidace musí probíhat podle příslušných bezpečnostních předpisů. Nikdy nepipetujte ústy.
- Zabraňte mikrobiologickému znečištění reagensů, neboť toto by způsobilo nesprávné výsledky.
- Nedodržení příslušných inkubačních dob a teplot může vést k chybným výsledkům. Jakoukoliv změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit.
- Reagenty byly optimálně nařaděny a další ředění by mohlo způsobit ztrátu zbarvení antigenu. Jakoukoliv změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit.
- Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
- Konzervační látkou v reagensu je buď ProClin 300 nebo azid sodný (NaN₃). Symptomy nadměrné expozice látkou ProClin 300 nebo NaN₃ zahrnují podráždění kůže a očí a podráždění sliznic a horních dýchacích orgánů. Koncentrace ProClin 300 ve výrobku je 0,05% a nenaplnuje tak kritéria OSHA pro nebezpečnou látku. U citlivých jedinců se mohou vyskytnout systémové alergické reakce. Koncentrace NaN₃ ve výrobku je 0,1 % a nenaplnuje tak kritéria OSHA pro nebezpečnou látku. Usazeniny NaN₃ mohou reagovat s olovem a mědí v potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů v potrubí.

NÁVOD K POUŽITÍ

Jednotlivé kroky postupu

Primární protilátky Ventana byly vyvinuty za účelem použití v barvicích automatech Ventana ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím výrobce Ventana. Doporučené barvicí protokoly pro barvicí automaty jsou uvedeny v tabulce 1. Parametry automatických postupů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v Návodu k obsluze. Některé parametry obsluhy barvicího automatu skliček jsou předem nastaveny výrobcem.

Tabulka 1. Doporučené barvicí protokoly pro CONFIRM anti-Ki-67 (30-9)

| Typ postupu | Platforma nebo metoda | |
|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| | NexES IHC | BenchMark Series |
| Odstraňování parafínu | V systému offline | Zvolený |
| Úprava buněk (odmaskování antigenu) | 1 mM EDTA (pH 8,0), 2 minuty, deklotační komora 120 °C | Cell Conditioning 1, standardní |
| Enzym (proteáza) | Není vyžadováno | Není vyžadováno |
| Protílátka (primární) | Asi 32 minut, 37 °C | Asi 16 minut, 37 °C |
| A/B Blok (blokování biotinu) | Zvolený | Zvolený |
| Zesílit (amplifikace) | Volitelné | Volitelné |
| Kontrastní barvivo (hematoxylin) | Hematoxylin II, 4 minuty | Hematoxylin II, 4 minuty |
| Po kontrastním barvení | Modření, 2 až 4 minuty | Modření, 2 až 4 minuty |

Postupy barvení na barvicích automatech Ventana jsou následující. Další podrobné instrukce a další vlastnosti protokolu naleznete v Návodu k obsluze.

Barvicí automaty NexES IHC

Doporučené odmaskování antigenu:

- Parafín se ze skliček odstraňuje pomocí sérii xylenu a odstupňovaných alkoholů až po vodu a potom v lázni s puftrem. Provést odmaskování antigenu a přenést sklička do roztoku APK Wash (1X).
- Založit primární protílátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebné přídavné reagenty do přihrádky pro reagenty a umístit je do barvicího automatu. Zkontrolovat nádoby na tekutiny a odpad.
- Vysušit barevné konce skliček a potom je opatřit štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protilátce, který má být proveden.
- Vymout sklička zbavená parafínu, po odmaskování antigenu a opatřená štítky z roztoku APK Wash (1X). Zamezit vysychání tkání.

Ruční postup odmaskování antigenu

Ruční odmaskování antigenu je potřebné, používáte-li barvicí automat NexES IHC.

Postup zhodnocení antigenu (úprava buněk), (pro sklička s tkáněmi barvenými na automatu NexES IHC nebo pro ruční metody):

- Připravit deklotační komoru k použití.
- Umístit misku do komory. Poznámka: Před umístěním misky do komory zkontrolujte, zda je její vnější povrch suchý. Pokud by byl vnější povrch misky vlhký, deklotační komora bude vydávat rachotivý zvuk a voda v komoře bude mít za následek nesprávnou funkčnost komory.
- Slícovat držadla nádob s držadly komory.
- Naplnit misku 500 mL deionizované vody a umístit tepelný kryt (kruhový kryt) doprostřed misky. Poznámka: Tepelný kryt chrání plastové nádoby před zkroutčením.
- Umístíte každou nádobu Tissue-Tek, naplněnou 250 mL 10 mM citrátu sodného (pH 6,0) nebo puftrem EDTA buffer (pH 8,0) v souladu s tabulkou Doporučené barvicí protokoly v příbalovém letáku pro každou primární protílátku a příslušná sklička na tepelný kryt, který je umístěn uprostřed misky. Je-li to potřeba, lze nahradit Cell Conditioning 1 (pH 8,5) puftrem EDTA Buffer a Cell Conditioning 2 (pH 6,0) lze nahradit 10 mM citrátu sodného. Do komory lze umístit až 2 nádoby a je třeba se ujistit, že se obě dotýkají tepelného krytu.
- Přiklopit deklotační komoru víkem a zajistit (Slícujte šipku otevřeno s bílou tečkou na rukojeti misky. Uchopit rukojeť víka a otočit ve směru hodinových ručiček do místa uzavření; jakmile je víko uzavřeno, odvětrávací ventil sníží tlak na odvětrávací trysce).
- Otočte reostat na 10 a zajistíte polohu (asi 120 °C).
- Zapněte deklotační komoru a sledujte až tlak dosáhne 17 - 25 psi a až je teplota 120 ° - 125 °C. Jakmile teplota deklotační komory dosáhne potřebné hodnoty, odměřte kalibračními ručními stopkami dobu 2 minut, dokud časovač deklotační komory nedosáhne hodnot "reálného času". Jakmile se ruční stopky vypnou, vypnout časovač deklotační komory. Ohřev se vypne a kontrolka se přepne z pozice „ohřev“ na „udržování tepla“. Poznámka: Technici musí sledovat teplotní a tlakové podmínky, aby byly dodrženy potřebné specifikace.
- Jakmile je procedura zhodnocení antigenu dokončena, vypnout deklotační komoru.
- Technici mohou sledovat klesající tlak pravidelnou kontrolou tlakoměru. Jakmile tlak klesne na 0 psi, deklotační komoru lze nyní bezpečně otevřít. Otočte víko proti směru hodinových ručiček a pomalu odkryjte, abyste si neopařili ruce. Poznámka: Při odklopování víka buďte velmi opatrní, neboť povrch i kapalina jsou stále velmi horké.
- Vymout nádoby se skličky z misky a umístit stojany se zpracovanými skličky do nádob s deionizovanou vodou pokojové teploty.
- Jakmile dokončíte oplachování, umístíte sklička do stojanu na sklička Tissue-Tek naplněného deionizační vodou k provedení hydratace, než jsou sklička opatřena čárovým kódem. Jedno po druhém sklička vymout ze stojanu; vysušit matné konce a zkontrolovat, zda se tkáňové řezy během procesu nevysušily. Opatřit sklička příslušným štítkem s čárovým kódem a vrátit je do nádoby na sklička. Opakovat tento postup se všemi skličky.
- Jakmile jsou všechna sklička opatřena štítky, vylít deionizovanou vodu z nádob se skličky a naplnit roztokem APK Wash (1X). Sklička musí zůstat v roztoku až do provedení barvicího cyklu.

Sériové barvicí automaty BenchMark Series

- Opatřit sklička štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protilátce, která má být zpracována.
- Založit primární protílátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebné přídavné reagenty do přihrádky pro reagenty a umístit je do barvicího automatu. Zkontrolovat nádoby na tekutiny a odpad.

3. Vložit sklička do barvicího automatu.

Pro všechny přístroje

1. Spustit barvicí cyklus.
2. Po dokončení cyklu vyjmout sklička z barvicího automatu.
3. Používáte-li detekční soupravy DAB a Alkaline Phosphatase Red, umyjte jemným čisticím prostředkem nebo v alkoholu, aby se odstranil krycí roztok; dehydrujte, projasněte a pokryjte obvyklým způsobem permanentním montovacím médiem.
4. Použije-li se AEC chromogen, nedehydratovat a neprojasňovat. Pro AEC použít vodné montovací médium. Obarvená sklička by měla být odečtena během 2 až 3 dnů od barvení a jsou stabilní po dobu nejméně 2 let, jsou-li správně skladována při pokojové teplotě (15 °C – 25 °C).

Postupy kontroly kvality

Tkáň pro pozitivní kontrolu

S každým provedeným barvicím postupem je třeba provést kontrolu pozitivních tkání. Příkladem vhodné pozitivní kontroly pro CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) jsou mandle nebo lymfatická uzlina. Komponenty tkání pro pozitivní kontrolu (jádra cyklických buněk) se používají k potvrzení, že protilátka byla aplikována a že přístroj pracuje správně. Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo komponenty tkáně a slouží jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní vzorky by měly být čerstvé fixované vzorky z pitvy, biopsie nebo operace zpracované co nejdříve a zalité stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou monitorovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechny reagentie a kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je vhodnější pro optimální kontrolu kvality a zjištění nižších úrovní degradace reagentie.

Známe pozitivní kontroly tkání by měly být používány pouze ke sledování správné účinnosti zpracovaných tkání a testovacích reagentií, nikoliv jako pomůcka ke stanovení specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovacích vzorků za neplatné.

Tkáň pro negativní kontrolu

Pro negativní kontrolu lze použít stejnou tkáň, která se používá pro pozitivní kontrolu. Rozmanitost různých typů buněk, které se nacházejí ve většině řezů tkání, nabízí vnitřní oblasti pro negativní kontrolu, ale to by měl ověřit uživatel. Části, které se nebarví, by měly prokázat nepřítomnost specifického zbarvení a zajistit indikaci nespecifického zbarvení pozadí. Pokud se projeví specifické zbarvení v částech tkáně pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Nevysvětlitelné rozpory

Nevysvětlitelné rozpory v kontrolách by měly být ihned ohlášeny místnímu zastoupení společnosti Ventana. Pokud se výsledky kontrol neshodují se specifikacemi, výsledky tkáně pacienta jsou neplatné. Objevili-li se rozpory, prostudujte část Řešení problémů tohoto letáku. Identifikovat a opravit problém a potom opakovat vzorek pacienta.

Reagentie pro negativní kontrolu

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s reagentií pro negativní kontrolu. Kontrola negativního reagens je použita místo primární protilátky, aby se dalo vyhodnotit nespecifické zbarvení. Sklička je třeba obarvit podle návodu CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Je-li pro negativní kontrolu použito jiné reagentie, naředte jí ve stejném poměru jako antisérum primární protilátky ředícím roztokem Ventana Antibody Diluent. Jako méně vhodnou alternativu uvedených reagentií pro negativní kontrolu lze použít samotný ředící roztok. Inkubační doba reagentie pro negativní kontrolu by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

Pokud se panely řady protilátek používají se sériovými řezy, může reagentie pro negativní kontrolu na jednom podložním skle sloužit jako negativní kontrola nebo kontrola nespecifické vazby pozadí pro jiné protilátky.

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostické proceduře by měla být ověřena specifita protilátky testováním na řadě dostupných tkáních se známou imunohistochemickou účinností, které představují známé pozitivní a negativní tkáně (seznamte se s Postupy kontroly kvality popsané v této části příbalového letáku a s požadavky pro kontrolu kvality akreditačního programu *College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist*,⁷ a schválenou směrnicí NCCLS⁸ nebo oběma dokumenty). Tyto postupy kontroly kvality musí být provedeny vždy, když se změní šarže protilátky nebo když se změní parametry testu. K ověření testu jsou vhodné tkáně uvedené v seznamu v části Souhrn očekávaných výsledků.

Interpretace výsledků

Imunologický postup barvení na automatech Ventana způsobuje barevnou reakci produktu, vedoucí k sražení oblastí antigenu lokalizovaných primární protilátkou. Očekávané barevné reakce nalezete v příbalovém letáku k příslušné detekční soupravě. Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog mající zkušenosti s imunohistochemickými postupy vyhodnotit pozitivní a negativní kontroly.

Tkáň pro pozitivní kontrolu

Nejprve je nutné provést test zbarvené tkáně pro pozitivní kontrolu a ověřit tak správnost funkce všech reagentií. Přítomnost správně zbarveného reakčního produktu uvnitř cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. Očekávané barevné reakce nalezete v příbalovém letáku k příslušné detekční soupravě. V závislosti na délce inkubační doby a potenci použitého hematoxylinu způsobí kontrastní barvení bleděmodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.

Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Tkáň pro negativní kontrolu

Tkáň pro negativní kontrolu je nutno testovat po tkání pro pozitivní kontrolu, abychom ověřili specifitu značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkání pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost zkrácené reaktivity s buňkami nebo částmi buněk. Pokud se projeví specifické zbarvení ve tkání pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Pokud se vyskytuje nespecifické zbarvení, je většinou difúzní. Sporadické slabé zbarvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech z tkání příliš fixovaných formalinem. K interpretaci výsledků použijte intaktní buňky, protože nekrotické a degenerované buňky se často zbarvují nespecificky.

Tkáň pacienta

Vzorky pacienta je nutno testovat jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je nutno posuzovat v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí reagentií pro negativní kontrolu. Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkání přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek (viz část Souhrn očekávaných výsledků). Ke správné interpretaci každého imunohistochemického výsledku by měla být testována rovněž morfolgie každého vzorku tkáně s využitím řezů barvených hematoxylinem a eozinem. Morfologické nálezy pacientů a klinické údaje týkající se pacientů by měly být interpretovány kvalifikovaným patologem.

OMEZENÍ

Všeobecná omezení

1. Imunohistochemie je diagnostický proces obsahující více kroků, který vyžaduje specializované vyškolení ve výběru vhodných reagentií, výběru tkání, fixaci, přípravě a zpracování imunohistochemického podložního skla a interpretaci výsledků zbarvení.
2. Zbarvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, umývání, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, zachycení protilátky nebo falešně negativním výsledkům. Výsledky mohou být nekonzistentní v důsledku použití různých metod fixace a zalití nebo v důsledku vnitřních nepravidlostí v tkání.
3. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinického projevu, morfolgie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studiemi a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými testy. Protilátka je určena k použití v panelu protilátek. Za interpretaci barveného preparátu zodpovídá kvalifikovaný patolog, který zná použité protilátky, reagentie a použité metody. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních skl a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
5. Ventana dodává protilátky a reagentie pro použití optimálně nařaděné, pokud jsou dodrženy instrukce, které jsou součástí produktu. Jakákoli odchylka od doporučených testovacích postupů může způsobit neočekávané výsledky. Je nutno provést a zdokumentovat příslušné kontroly. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.

- Tento výrobek není určen k použití v průtokové cytometrii, neboť charakteristiky účinnosti nebyly stanoveny.
- Reagencie mohou vykazovat neočekávané reakce v dřívě netestovaných tkáních. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmách nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí i v testovaných skupinách tkání.⁹ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
- Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenovou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.¹⁰
- Normální séra ze stejného živočišného zdroje jako sekundární antiséra použitá v blokovacích krocích mohou v důsledku přítomnosti autoprotilátek nebo přirozených protilátek způsobovat falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
- Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty) a endogenní aktivitou peroxidázy (cytochrom C), alkalickou fosfatázou nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu imunologického barvení.¹¹
- Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

Specifická omezení

- Protilátka byla optimalizována pro 16 minutovou inkubační dobu na barvicím automatu BenchMark Series a 32 minutovou inkubační dobu na automatu NexES IHC a detekční soupravu MIEW DAB. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba zvýšit nebo snížit inkubační doby primární protilátky na jednotlivých vzorcích. Protilátka nevytvářila správný vzor zbarvení, když byla použita na tkáních fixovaných Bouinovým fixativem. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „*Immunohistochemistry Principles and Advances*“¹²
- Protilátka ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím Ventana detekuje antigen, který přežívá běžně provedenou fixací ve formalínu, zpracování tkáně a její nařezání. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.

SOUHRN OČEKÁVANÝCH VÝSLEDKŮ

- Specifická protilátka CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) byla stanovena testováním normálních a neoplastických tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) vykazovala křížovou reaktivitu v cytoplazmě některých typů skeletálního a srdečního svalu, ale je nepravděpodobná záměna s nukleárním vzorem Ki-67. Výsledky u normálních tkání byly následující: mozková dřev, zbarvil se 1 ze 3 případů; malý mozek, nezabarvil se žádný ze 3 případů; nadledvina, zbarvil se 3 ze 3 případů; vaječník, zbarvil se 2 ze 2 případů; slinivka břišní, zbarvil se 3 ze 3 případů; příštítná žláza, zbarvil se 2 ze 3 případů; hypofýza, zbarvil se 3 ze 3 případů; varlata, zbarvil se 3 ze 3 případů; štítná žláza, zbarvil se 2 ze 3 případů; prs, zbarvil se 3 ze 3 případů; slezina, zbarvil se 3 ze 3 tkání; mandle, zbarvil se 3 ze 3 případů; brzlík, zbarvil se 3 ze 3 případů; kostní dřev, nezabarvil se žádný ze 3 případů; plíce, zbarvil se 1 ze 3 případů; srdce, zbarvil se 1 ze 3 případů; jícen, zbarvil se 2 ze 3 případů; žaludek, zbarvil se 3 ze 3 případů; tenké střevo, zbarvil se 2 ze 3 případů; tračník, zbarvil se 3 ze 3 případů; játra, zbarvil se 1 ze 3 případů; slinná žláza, zbarvil se 2 ze 3 případů; ledvina, zbarvil se 2 ze 3 případů; prostata, zbarvil se 2 ze 2 případů; děloha, zbarvil se 2 ze 2 případů; děložní hrdlo, zbarvil se 2 ze 3 případů; příčně pruhovaný sval, nezabarvil se žádný ze 3 případů; kůže, zbarvil se 3 ze 3 případů; mezotel, nezabarvil se žádný z 1 případu. Následující neoplastické tkáně vykazovaly Ki-67 zbarvení: glioblastom, atypický meningiom, ependymom a oligodendrogliom v mozku; serózní a mukózní papilární adenokarcinom vaječníku, karcinom ostrůvkových buněk, karcinom jater, adenokarcinomy slinivky břišní, jícnu, plic, žaludku, tenkého střeva, tračníku, rekta, prostaty, dělohy a děložního hrdla; testikulární seminom a embryonální karcinom; medulární a papilární karcinom hypofýzy; infiltrující ductální karcinom prsu; B buněčný lymfom ve slezině; tři karcinomy skvamózních buněk, mezenchymom v tenkém střevu, hepatocelulární karcinom a hepatoblastom; rhabdomyosarkom příčně pruhovaném svaly; neurofibrom a neuroblastom; melanom, sarkom, nediferencovaný karcinom, karcinoidy a lymfom. Následující neoplastické tkáně nevykazovaly zbarvení: intraduktální karcinom prsu; karcinom jasných buněk v ledvině a leiomyom v děloze.
- Senzitivita je závislá na konzervaci antigenu. Jakákoli nesprávná manipulace s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo uchovávání, která mění antigennost, zeslabuje detekci Ki-67 při použití CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) a může mít za následek falešně negativní výsledky.

ŘEŠENÍ PROBLÉMU

- Jestliže vykazují pozitivní kontroly slabší zbarvení než je očekáváno, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních reagentů.
- Je-li pozitivní kontrola negativní, je třeba zkontrolovat, zda má sklíčko štítek se správným čárovým kódem. Jestliže je sklíčko opatřeno správným štítkem, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních reagentů. Sběr, fixace nebo odstraňování parafínů z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.
- Vyskytne-li se přílišné zbarvení pozadí, pravděpodobně jsou přítomny vysoké úrovně endogenního biotinu. Je třeba zahrnout krok blokování biotinu.
- Jestliže se nepodařilo odstranit všechny parafín, je třeba opakovat postup odstranění parafínu z tkání.
- Je-li zbarvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, opakujte cyklus s kratší inkubační dobou vždy o 4 minuty až do doby dosažení požadované intenzity barvení.
- Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou podložní skla pozitivně nabita.
- Při nápravě odkazujeme na část Jednotlivé kroky postupu a Návod k obsluze barvicího automatu nebo se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.

REFERENCE

- Keng PC, Siemann DW. Measurement of proliferation activities in human tumor models: a comparison of flow cytometric methods. *Radiat Oncol Investig*, 6(3): 120-7, 1998.
- Rey A Lara PC. Ki67 proliferation index in tumors of the upper urinary tract as related to established prognostic factors and long-term survival. *Arch Esp Urol*, 51(2): 204-10, 1998.
- Bacchi CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res*, 26(7): 677-87, 1993.
- Alliegro M. Coiled body heterogeneity induced by G(1) arrest with amiloride bumetanide. *Exp Cell Res*, 279(1): 111-17, 2002.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein from the know and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3): 311-22, 2000.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
- NCCLS. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. NCCLS document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
- Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 73(5): 626-32, 1980.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

Duševní vlastnictví

CONFIRM™, EZ Prep™, *ultraView*™ a Liquid Coverslip™ jsou ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.; BenchMark®, NexES® a Ventana® jsou registrované ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.

Ventana poskytuje kupujícímu jednorázovou licenci v souladu s následujícími patenty: Patent USA, č. 6045 759, 6192 945, 6416 713, 6945 128 a zahraniční stejnopisy.

KONTAKTNÍ INFORMACE

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)



www.ventanamed.com

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany